

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 040 833 A1

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(43) Date of publication:  
04.10.2000 Bulletin 2000/40(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: A61K 35/20

(21) Application number: 00106844.4

(22) Date of filing: 30.03.2000

(84) Designated Contracting States:  
 AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
 MC NL PT SE  
 Designated Extension States:  
 AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: 30.03.1999 JP 8994699

(71) Applicant:  
 SNOW BRAND MILK PRODUCTS, CO., LTD.  
 Sapporo-shi Hokkaido 065-0043 (JP)

(72) Inventors:  
 • Takada, Yukihiro  
 Saitama-ken (JP)

- Serizawa, Atushi  
 Saitama-ken (JP)
- Ishikawa, Hidetoshi  
 Sapporo-shi Hokkaido (JP)
- Yoshioka, Tomoe  
 Hokkaido (JP)
- Aoe, Seiichiro  
 Saitama-ken (JP)

(74) Representative:  
 VOSSIUS & PARTNER  
 Siebertstrasse 4  
 81675 München (DE)

## (54) Bone resorption suppressing agent

(57) A highly safe bone resorption suppressing agent, which can be used as medicine or admixed to food products or feeds, is produced. Milk-derived basic cystatins and/or milk-derived basic cystatin decomposition products prepared from milk are made into bone resorption suppressing agents, or admixed to drinks, food products and feeds.

**Description**

[0001] The present invention relates to bone resorption suppressing agents comprising a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product as an effective component, and in particular to bone resorption suppressing agents to be used for the prevention and treatment of bone joint diseases or periodontal diseases.

[0002] The present invention also relates to drinks, food products and feed in which a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are admixed to provide an activity to prevent and treat bone joint diseases or periodontal diseases. In particular, the present invention relates to drinks, food products and feed to which a highly absorbable calcium composition and vitamin D and/or vitamin K, in addition to a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product, are admixed to provide an activity to prevent and treat bone joint diseases or periodontal diseases.

[0003] In recent years, the number of people suffering from bone joint diseases such as osteoporosis and rheumatism has been on the rise because of the aging population. Bone formation and bone resorption continuously take place in bone tissue and are well balanced in early life, but the balance is lost with an increase in bone resorption with aging for various reasons. If this unbalance continues for a long period of time, the bone tissue becomes fragile, which results in bone diseases such as osteoporosis, bone fractures and lumbago. It is believed that if this uncoupling can be prevented, osteoporosis, bone fractures, lumbago or the like can be prevented.

[0004] Conventional methods to prevent and treat bone diseases by preventing the uncoupling include (1) dietary supplementation of calcium, (2) moderate exercise, (3) sunbathing, and (4) therapy by medicines.

[0005] For dietary supplementation, calcium salts such as calcium carbonate and calcium phosphate, natural calcium supplements such as bovine bone powders, egg shells and fish bone powders are used. To date, such food products and food materials have been used exclusively for calcium supplementation.

[0006] For moderate exercise, moderate running or walking are highly recommended. However, even moderate exercise is difficult for people who are physically weak and, not to mention, almost impossible for elderly people who are confined to bed.

[0007] Sunbathing is good for the supplementation of activated vitamin D<sub>3</sub>, but not sufficient by itself

[0008] As for therapeutic medicines, 1 $\alpha$ -hydroxy vitamin D<sub>3</sub>, calcitonin preparations or the like are known to be effective to cure and treat osteoporosis. Calcitonin preparations are medicinal hormone preparations. Safe substances for calcitonin obtainable from food materials have not been presently studied. Calcitonin is difficult to prepare in bulk and to provide as a safe food material since animal tissues, cells, blood, or urine have to be used as raw materials.

[0009] It is believed that rheumatism, a joint disease, can be prevented and treated by suppressing bone resorption since it is associated with the bone resorption.

[0010] In recent years, periodontal diseases have also become a serious social problem. Unlike dental caries, periodontal diseases weaken the roots of teeth, which makes even healthy teeth useless. Today, many people develop symptoms of periodontal diseases. Periodontal diseases can be more serious than dental caries.

[0011] Today, means to prevent periodontal diseases are to prevent the growth of causative microorganisms, for example, the removal of dental plaque or gargling using mouthwashes containing antibacterial agents or the like. However, these means seem to be less effective for highly developed symptoms. Namely, in the late stage of periodontal diseases, the alveolar bone mass decreases, and once alveolar bones are lost, unregenerable symptoms occur. Teeth loss due to periodontal diseases then makes eating difficult and painful, which is disturbing in everyday life. Thus, there is a need for effective means for the prevention and treatment of periodontal diseases.

[0012] However, so far, there is no agent available for the prevention and treatment of periodontal diseases which effectively suppresses a decrease in alveolar bone mass.

[0013] Thus, like osteoporosis, periodontal diseases have become a serious social problem. Therefore, an effective treatment for periodontal diseases will greatly contribute to people's health, and accordingly is necessary.

[0014] The present inventors intensively searched for a milk whey fraction having osteoblast growth stimulating activity, bone resorption suppressing activity and bone strengthening activity, in order to obtain a material which can be used for the prevention and treatment of bone junction diseases and periodontal diseases. Namely, the present inventors fractionated proteins in milk, in particular milk whey, in an attempt to obtain a fraction having a bone resorption suppressing activity, and found a bone strengthening activity in a protein-peptide mixture which was obtained by treating a water soluble fraction of whey proteins with a reverse osmotic membrane or electrodialysis to remove whey-derived salts (Japanese Patent Laid-open No. 4-183371). Furthermore, the present inventors found that a fraction obtained by treating an aqueous solution of this protein-peptide mixture with ethanol, heat, salts or an ultrafiltration membrane has a bone strengthening activity (Japanese Patent Laid-open No. 5-176715, Japanese Patent Laid-open No. 5-320066). The present inventors also found that basic proteins present in milk in trace amounts have an osteoblast collagen synthesis stimulating activity and bone resorption suppressing activity (Japanese Patent Laid-open No. 8-151331).

[0015] Cystatin is a cysteine protease inhibitor which inhibits proteolytic activity of cysteine proteases having an SH

group in the active center and is found in animal tissues, cells and urine. A virus growth inhibiting activity was recognized as a useful activity of cystatin (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 127, p. 1072, 1985).

[0016] Japanese Patent Laid-open No. 2-223529 describes the use of cystatin as anti-allergic agents and as therapeutic agents for bone diseases in the form of an injectable preparation, suppository, nasal powder or the like. More specifically, it described a test result wherein the blood calcium level was reduced in rats by intravenously injecting rats with rat-derived cystatin prepared by genetic engineering. However, one cannot readily conclude that cystatin has an activity to prevent and treat bone joint diseases such as osteoporosis and rheumatism, solely from this result.

[0017] Furthermore, until now, a bone resorption suppressing agent comprising a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product which is effective by administration orally but not necessarily intravenously, as an effective component, is not known. Also, a drink, food product or feed which contains such components in higher concentrations, along with calcium and vitamins, and can be administered orally is not known.

[0018] Although the present inventors previously applied for a patent (Japanese Patent Laid-open No. 7-126294) on a cysteine protease inhibitor other than the milk-derived basic cystatin, the bone resorption suppressing activity of the milk-derived basic cystatin of the present invention is higher than that of said inhibitor.

[0019] The present inventors tried to isolate and purify an active substance from of basic protein fraction having a bone resorption suppressing activity, identified the resulting substance, and found this substance is a milk-derived basic cystatin. Furthermore, the present inventors found that the milk-derived basic cystatin has a particularly high bone resorption suppressing activity as compared with cystatins from other origins. Further, the present inventors found that a decomposition product of the milk-derived basic cystatin also has a high bone resorption suppressing activity.

[0020] Accordingly, the objective of the present invention is to provide bone resorption suppressing agents comprising the milk-derived cystatin and/or milk-derived cystatin decomposition product as an effective component, and drinks, food products and feeds in which the milk-derived cystatin and/or milk-derived cystatin decomposition product are admixed to provide a bone resorption suppressing activity.

[0021] Further, the present invention is industrially useful because a highly safe milk-derived basic cystatin can be prepared in bulk from a food material, i.e., milk, and admixed as a safe food material.

[0022] The present inventors found that a milk-derived basic cystatin and a milk-derived basic cystatin decomposition product have an excellent bone resorption suppressing activity.

[0023] Namely, the present invention provides bone resorption suppressing agents comprising the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product as an effective component. Further, the present invention can provide a bone resorption suppressing activity to drinks, food products and feed by admixing them with the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product. Further, the present invention can provide both a bone resorption suppressing activity and bone formation stimulating activity to drinks, food products and feed by admixing them with the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product and with a highly absorbable calcium component and vitamin D and/or vitamin K.

[0024] More specifically, based on the above mentioned bone resorption suppressing activity of the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product, bone resorption suppressing agents can be provided, which comprise milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product as an effective component for the prevention and treatment of bone joint diseases or periodontal diseases. Also, drinks, food products and feeds having activities to prevent and treat bone joint diseases or periodontal diseases can be provided by admixing them with milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition products.

[0025] The present invention provides a bone resorption suppressing activity to drinks, food products and feed by admixing the safe milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product prepared using cow's milk, a food product, as a raw material.

[0026] Examples of milk to be used as a raw material for the milk-derived basic cystatin include raw milk, powdered milk, skimmed milk, and reconstituted milk. The milk-derived basic cystatin can be obtained from these milk materials by heating, salt treatment, ethanol treatment, various chromatographic methods, such as ion exchange chromatography and gel filtration chromatography, treatment with an ultrafiltration membrane, or the like.

[0027] A milk-derived basic cystatin decomposition product of the present invention is a peptide mixture prepared by restrictively decomposing the above-mentioned milk-derived basic cystatin with proteases, such as trypsin, chymotrypsin, pepsin, papain, kallikrein, cathepsin, thermolysin, and B8 protease.

[0028] In the present invention, the above-mentioned milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are added to drinks and food products to provide them with bone resorption suppressing activity. Examples of such drinks and food products include milk, milk drinks, juices, jellies, biscuits, breads, noodles, and sausages. Bone joint diseases, such as osteoporosis and rheumatism, and periodontal diseases can be prevented or treated by ingesting such drinks and food products to which the bone resorption suppressing activity is provided.

[0029] In the present invention, a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are used as medicines, or admixed into drinks, food products and feed as an effective component for the prevention or treatment of bone joint diseases, such as osteoporosis and rheumatism, in an amount of about 8 µg to 10 mg per

day for an adult, to be administered in divided doses. In particular, the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are preferably admixed into drinks, food products or feed, at a concentration of more than 4 µg% so as to easily attain the above-mentioned dosage.

5 [0030] In the present invention, a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are used as medicines, or admixed into drinks, food products and feed as an effective component for the prevention or treatment of periodontal diseases, for example in a form of tooth paste, mouth wash, candy, chewing gum or troche by bringing them into contact with the tooth surface in an amount of about 8 µg to 10 mg per day for an adult to be administered in divided doses.

10 [0031] A highly absorbable calcium salt having an excellent absorbability is preferably admixed into bone resorption suppressing agents, drinks, food products and feed of the present invention. Examples of the highly absorbable calcium salt include calcium chloride, calcium carbonate, calcium lactate, egg shells and substances containing milk-derived calcium. Effective components for bones, such as vitamin D and vitamin K, can also be admixed. In such cases, the desirable synergistic effect of the bone formation stimulating activity provided by admixing the above-mentioned highly absorbable calcium and vitamins with the bone resorption suppressing activity provided by a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product can be attained.

15 [0032] Milk-derived basic cystatin has bone resorption suppressing activity when ingested as an admixture in food products and is an excellent material for food processing because of its good heat stability.

20 [0033] The present invention will be explained in detail in the following examples and test examples.

## Example 1

### Preparation of milk-derived basic cystatin

25 [0034] A column filled with S-Sepharose (3,000 g) was thoroughly washed with deionized water. Skimmed milk (10,000 L) was passed through the column, the column was thoroughly washed with deionized water, then elution was carried out with a linear concentration gradient of 0.1 to 1.0 M sodium chloride. The eluted fraction was heated at 90°C for 10 minutes and centrifuged to remove precipitates. Next, the resulting fraction containing milk-derived basic cystatin was again fractionated using MonoS ion exchange chromatography. The fraction thus obtained was fractionated using MonoQ ion exchange chromatography and Superose 12 gel filtration chromatography using an HPLC system, then further by hydroxyapatite chromatography, and C4 reverse phase chromatography using an HPLC system to obtain a milk-derived basic cystatin (fraction A, 58 mg).

## Example 2

### Preparation of milk-derived basic cystatin

35 [0035] A 5% milk whey protein solution (10,000 L) was heated at 90°C for 10 minutes and centrifuged to remove precipitates. A column was filled with a carrier, in which carboxymethylated papain was bound to Tresyl-Toyopearl (a product of Toso), and equilibrated with a 0.5 M sodium chloride solution. The resulting solution was passed through this column, after which the column was washed with a 0.5 M sodium chloride solution, then a 0.5 M sodium chloride solution containing 0.1% Tween 20. Next, cysteine protease was eluted with a 20 mM acetic acid-0.5 M sodium chloride solution. The eluted fraction was immediately neutralized with a 1 M sodium hydroxide solution, then fractionated on MonoS anion exchange chromatography, then hydroxyapatite chromatography and C4 reverse phase chromatography using an HPLC system to obtain a milk-derived basic cystatin (fraction B, 48 mg).

## Example 3

### Preparation of milk-derived basic cystatin decomposition product

45 [0036] Fraction A (25 mg) obtained in Example 1 was suspended in 100 ml of water, pancreatin was added at a final concentration of 1%, and enzyme treatment was carried out at 37°C for 5 hours. Then, the enzyme was inactivated by heating at 90°C for 5 minutes, after which the resulting substance was freeze-dried to obtain a milk-derived basic cystatin decomposition product (fraction C, 23 mg).

50 [0037] Fraction B (25 mg) obtained in Example 2 was similarly treated to obtain a milk-derived basic cystatin decomposition product (fraction D, 24 mg).

## Test Example 1

Bone resorption suppressing activity of milk-derived basic cystatins and milk-derived basic cystatin decomposition products

5 [0038] Splint bones of ICR mice (10-20 days of age) were taken out, soft tissues were removed, then the bones were mechanically ground in an  $\alpha$ -MEM solution containing 5% fetal calf serum to obtain whole bone cells including osteoclasts. These cells (about  $2 \times 10^6$ ) were spotted on an ivory piece using an  $\alpha$ -MEM solution containing 5% fetal calf serum. After several hours, an  $\alpha$ -MEM solution containing 5% fetal calf serum, to which a milk-derived basic cystatin or a milk-derived basic cystatin decomposition product was added at a concentration of 50 ng/ml, was added to the spot, and the ivory piece was incubated in the presence of 5%  $CO_2$  at 37°C for 5 days to examine bone resorption activity of osteoclasts.

10 [0039] After incubation, cells on the ivory piece were peeled, stained with hematoxylin, and subjected to image analysis using an image analyzing device (PIASLA-555, a product of PIAS) to count the number of bone resorption pits.

15 The bone resorption activity (%) as defined in the following formula is obtained from the counts to evaluate the bone resorption suppressing activity.

$$\text{Bone resorption activity (\%)} = (\text{bone resorption pit count for group with added test sample} \\ / \text{bone resorption pit count for group without added test sample}) \times 100$$

20 [0040] Test samples used were milk-derived basic cystatins and milk-derived basic cystatin decomposition products (fractions A to D) obtained in Examples 1, 2 and 3, and the following non-milk origin cystatins, and a milk-derived cysteine protease inhibitor.

25 1. Cystatin (egg white; purity more than 99%)  
 2. Cystatin (human placenta; purity more than 99%)  
 3. Cystatin (human plasma; purity more than 99%)  
 4. Cystatin (bovine urine; purity more than 99%)  
 30 5. Cystatin (bovine plasma; purity more than 99%)  
 6. Cysteine protease inhibitor (see Japanese Patent Laid-open No. 95-126294)  
 (bovine milk; purity more than 99%)

35 [0041] Results are shown in Table 1. Bone resorption activity was suppressed better in cells cultured in a medium supplemented with milk-derived basic cystatins or milk-derived basic cystatin decomposition products than in cells cultured in a medium without these supplements. Further, milk-derived basic cystatins and milk-derived basic cystatin decomposition products (fractions A to D) showed marked bone resorption suppressing activity as compared with cystatins of other origins, and thus an excellent bone resorption suppressing activity of milk-derived basic cystatins was confirmed.

Table 1

Test sample	Bone resorption activity (% $\pm$ SD)
Fraction A	44.2 $\pm$ 6.9
Fraction B	55.8 $\pm$ 5.2
Fraction C	32.5 $\pm$ 5.6
Fraction D	41.3 $\pm$ 4.7
Cystatin (egg white)	75.1 $\pm$ 3.5
Cystatin (human placenta)	78.1 $\pm$ 2.9
Cystatin (human plasma)	79.5 $\pm$ 1.9
Cystatin (bovine urine)	77.2 $\pm$ 3.7
Cystatin (bovine plasma)	68.7 $\pm$ 3.3

Table 1 (continued)

Test sample	Bone resorption activity (% $\pm$ SD)
Cysteine protease inhibitor (bovine milk)	64.3 $\pm$ 2.5

5

## Test Example 2

Bone resorption suppressing activity and bone strengthening activity of milk-derived basic cystatin and milk-derived basic cystatin decomposition product

[0042] Fractions A and C obtained in Examples 1 and 3, respectively, were administered to osteoporosis model rats to study their effect on bone resorption suppression.

[0043] Feeds used for the administration test were a feed admixed with fraction A or fraction C and a feed admixed with fraction A or fraction C, a highly absorbable milk-derived calcium component (milk Ca, see Japanese Patent Laid-open No. 1992-306622) as a calcium source, and 200 IU of vitamin D.

[0044] Compositions of the feeds used in the administration test are shown in Table 2. The amount of both calcium and phosphate was 300 mg per 100 g feed in all test groups so that a calcium to phosphate ratio was 1:1.

20

Table 2

	Control	Sham	Fraction		Fraction + Milk Ca <sup>2+</sup> + VD <sup>3</sup>	
			A	C	A	C
Sucrose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Casein	20.0	20.0	18.0	18.0	18.0	18.0
Cornstarch	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture (including choline)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral mixture	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>2)</sup>	4.5 <sup>2)</sup>
Fraction A	-	-	0.0004	-	0.0004	-
Fraction C	-	-	0.0004	-	0.0004	-

(Units: g/100 g)

40

1) Calcium carbonate was admixed as a calcium source.

2) Milk-derived calcium component was admixed as a calcium source.

3) 200 IU of vitamin D were admixed.

[0045] Female SD rats (32 weeks of age) were used for experimental animals. After preliminary rearing for one week, an ovariectomy was performed, then the rats were reared further for 2 weeks on a low calcium diet to create osteoporosis model rats. Sham operations without an ovariectomy were performed on 7 rats to make sham rats.

[0046] The above-mentioned rats were divided into six groups (7 rats in one group), i.e., control group, sham group, fraction A group, fraction C group, fraction A + milk calcium + vitamin D group, and fraction C + milk calcium + vitamin D group, and rats in each group were fed the test feeds shown in Table 2, for one month.

[0047] After administering the test feeds, thigh bones of rats in each test group were removed, the amount of bone mineral was measured by a bone mineral measuring device, and the bone strength was measured by a tension fracture characteristic measuring device.

[0048] Results are shown in Table 3 and Table 4.

[0049] As shown in Table 3, the amount of bone mineral was statistically greater in animals fed the feed admixed with fraction A or fraction C as compared to those in the control group. Accordingly, it was revealed that fraction A and fraction C had bone resorption suppressing activity. The activity was further augmented by the addition of highly absorbable milk calcium and vitamin D.

[0050] As shown in Table 4, the bone strength was statistically higher in animals fed the feeds admixed with fraction

A or fraction C than in the control animals. Accordingly, it was revealed that fraction A and fraction C had bone strengthening activity. Further, the activity was further augmented by the addition of highly absorbable milk calcium and vitamin D.

[0051] A similar result was obtained with the feed admixed with vitamin K instead of vitamin D.

[0052] The above-mentioned results showed that the milk-derived basic cystatin and milk-derived basic cystatin decomposition product had bone resorption suppressing activity and bone strengthening activity.

Table 3

	Bone mineral (mg, $\pm$ SD)
Sham	136.2 $\pm$ 6.3*
Control	116.3 $\pm$ 5.9
Fraction A	122.4 $\pm$ 4.3*
Fraction C	123.8 $\pm$ 5.1*
Fraction A + milk Ca + vitamin D	126.1 $\pm$ 2.9*
Fraction C + milk Ca + vitamin D	127.3 $\pm$ 3.1*

\* Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ )

Table 4

	Bone breaking energy ( $\times 10^5$ erg)
Sham	13.4 $\pm$ 2.6*
Control	8.3 $\pm$ 1.7
Fraction A	10.8 $\pm$ 3.1*
Fraction C	10.5 $\pm$ 4.1*
Fraction A + milk Ca + vitamin D	11.3 $\pm$ 2.3*
Fraction C + milk Ca + vitamin D	11.5 $\pm$ 2.6*

\* Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ )

#### Test Example 3

[0054] The ingredients shown in Table 5 were mixed, poured into containers and sterilized by heating to prepare drinks. Albumin was added to a control group to adjust the amount of proteins.

[0055] Twenty patients having osteoarthritis (shrinkage of joint cleavage) were divided into two groups with 10 patients in each group, and took the drinks for one month. The amount of urinary deoxypyridinoline, a bone metabolism marker for bone resorption, was measured before and after the period of drinking.

[0056] Results are shown in Table 6 and Table 7. As shown in Table 6, while the amount of deoxypyridinoline was reduced even in the control group having the drink with calcium and vitamin, it was reduced further more in the test group. This result suggests that bone resorption due to bone fracture was well suppressed. As shown in Table 7, various joint pains were also reduced by the intake of the drink. Furthermore, similar results were obtained by using cheese in which a milk-derived basic cystatin was admixed.

Table 5

Ingredients	Control group	Test group
Crystalline glucose	15.0	15.0 (% by weight)

Table 5 (continued)

Ingredients	Control group	Test group
Fraction A		0.000008
Albumin	0.000008	
Calcium	0.5	0.5
Vitamin D	(200 IU)	(200 IU)
Water	74.0	74.0

5

10

15

20

25

Table 6

	Reduction amount of deoxypyridinoline (nmol/day $\pm$ SD)
Control group	0.32 $\pm$ 0.3
Test group	0.99 $\pm$ 0.2*

\* Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

Table 7

	Number of patients			
	Control group		Test group	
	Before intake	After intake	Before intake	After intake
Physically strained joint pain	10	10	10	8
Joint pain with motion	5	5	6	2
Joint pain while asleep	5	4	5	0
Joint pain in exhaustion	8	8	9	5
Fatigue	7	7	6	1
Joint pain at the entire cleavage	9	8	9	3

45

## Test Example 4

[0058] Forty-eight golden hamsters (6 weeks of age) were preliminarily reared for one week, after which a sterilized silk suture No. 4 was coiled in five-ply around the M1 column dentis of each animal, and the animals were reared by feeding the feed of Keyes et al. (D#2000, Keyes, P.H. and Jordan: Archs. Oral. Biol., 9, 377-400, 1964) to induce periodontal diseases. Next, the resulting golden hamsters were divided into four groups, i.e., control group, fraction A group, fraction B group, and fraction C group. A test solution was prepared by appropriately diluting each fraction (4  $\mu$ g) and applied to the animals of each group 2 times a day every day, keeping the inside the oral cavity of the animals wet for about 10 minutes each time. Six animals of each group were selected 4 and 7 days after the application, both sides of lower jaw bones were excised after fixed perfusion with a 2.5% glutaraldehyde solution (pH 7.4) for about 20 minutes, then the reduction of alveolar bone mass was evaluated by the following method. Namely, both excised sides of lower bones were fixed with a 2.5% glutaraldehyde solution and soft-X-rayed, then the resulting photographs were analyzed using an image analyzing device (PIAS LA-555). The area between the enamel cement border and alveolar bone top

near M1 was measured to evaluate the reduction in alveolar bone mass.

[0059] Results are shown in Table 8. Reduction in alveolar bone mass in the golden hamsters in fraction A group, fraction B group and fraction C group was significantly lower as compared with that in the control group. Accordingly, it was revealed that the milk-derived basic cystatins and milk-derived basic cystatin decomposition product were effective in suppressing alveolar bone mass reduction and for preventing and treating periodontal diseases.

Table 8

	Control	Fraction A	Fraction B	Fraction C
Reduction in area (mm <sup>2</sup> )				
Day 4	0.31	0.16*	0.18*	0.15*
Day 7	0.98	0.53*	0.58*	0.47*

\*Significantly different from the control group (p < 0.05).

#### Example 4

##### Production of drink to which bone resorption suppressing activity was provided

[0060] The ingredients in Table 9 were mixed, fraction A (0.000004% by weight) and vitamin D (200 IU) were further added, then the admixture was poured into a container and sterilized by heating to produce a drink to which bone resorption suppressing activity was provided. This drink is useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

Table 9

Mixed isomerized sugars	15.0 (% by weight)
Fruit juice	10.0
Citric acid	0.5
Flavoring	0.1
Calcium	0.5
Water	73.9

#### Example 5

##### Production of tablets to which bone resorption suppressing activity was provided

[0061] The ingredients in Table 10 were mixed, fraction A (0.0005% by weight) and vitamin D (200 IU) were further added, then the admixture was molded under pressure to produce tablets to which bone resorption suppressing activity was provided. These tablets are useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

Table 10

Hydrous crystalline glucose	93.5 (% by weight)
Calcium	5.0
Sugar esters	1.0
Flavoring	0.5

## Example 6

Production of biscuits to which bone resorption suppressing activity was provided

5 [0062] The ingredients of Table 11 were mixed, fraction B (0.00005% by weight) was further added, then the resulting dough was molded and baked to produce biscuits to which bone resorption suppressing activity was provided. These biscuits are useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

Table 11

10	Flour	50.0 (% by weight)
15	Sugar	20.0
20	Table salt	0.5
	Margarine	12.5
	Egg	12.1
	Water	4.1
	Sodium hydrogencarbonate	0.1
	Ammonium bicarbonate	0.2
	Calcium carbonate	0.5

25

## Example 7

Production of jelly to which bone resorption suppressing activity was provided

30 [0063] The ingredients in Table 12 were mixed, fraction D (0.000008% by weight) was further added, then the admixture was poured into a container and sterilized by heating to produce jelly to which bone resorption suppressing activity was provided. This jelly is useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

Table 12

35	Fructose	20.0 (% by weight)
40	Granulated sugar	15.0
45	Starch syrup	5.0
	Agar	1.0
	Flavoring	0.1
	Calcium	0.1
	Water	58.8

## Example 8

Production of cheese to which bone resorption suppressing activity was provided

50 [0064] The ingredients in Table 13 were mixed, fraction A (0.00005% by weight) was further added, then the admixture was emulsified at an emulsifying temperature of 85°C to produce cheese to which bone resorption suppressing activity was provided. This cheese is useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

55

5 Table 13

Gouda cheese	43.0 (% by weight)
Cheddar cheese	43.0
Sodium citrate	2.0
Milk-derived calcium	1.0
Water	10.5

10

## Example 9

15 Production of yoghurt to which bone resorption suppressing activity was provided

16 [0065] Skim milk (12%) was pasteurized by heating at 90°C for 20 minutes, and *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* were individually inoculated to make two kinds of starter cultures. The ingredients in Table 12 including a yoghurt mix, whose major component is milk, were mixed, fraction B (0.000008% by weight) was further added, then the admixture was subjected to conventional fermentation and cooling to produce yoghurt to which bone resorption suppressing activity was provided. This yoghurt is useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

25

Table 13

Yoghurt mix	97.0 (% by weight)
Culture ( <i>L. acidophilus</i> )	1.5
Culture ( <i>S. thermophilus</i> )	1.5

30

## Example 10

35 Production of dog food to which bone resorption suppressing activity was provided

36 [0066] The ingredients in Table 15 were mixed, and fraction A (0.00001% by weight) was further added to produce a dog food to which bone resorption suppressing activity was provided. This dog food is useful for the prevention and treatment of bone joint diseases.

40

Table 15

Soybean cake	12.0 (% by weight)
Powdered skim milk	14.0
Soybean oil	4.0
Corn oil	2.0
Palm oil	28.0
Corn starch	15.0
Flour	9.0
Bran	2.0
Vitamin mixture	9.0
Mineral mixture	2.0
Cellulose	3.0

45

50

55

## Example 11

Production of tooth paste to which bone resorption suppressing activity was provided

5 [0067] The ingredients in Table 16 were mixed, fraction C (0.0001% by weight) was further added, the admixture was made into a cream and poured into a container to produce a tooth paste to which bone resorption suppressing activity was provided. This tooth paste is useful for the prevention and treatment of periodontal diseases.

Table 16

Glycerine	70.0 (% by weight)
Silicon dioxide	20.0
Xanthan gum	1.0
Mint flavoring	1.0
Titanium dioxide	0.7
Sodium fluoride	0.3
Distilled water	7.0

10

15

20

## Example 12

Production of gargle to which bone resorption suppressing activity was provided

25 [0068] The ingredients in Table 17 were mixed, and fraction B (0.00001% by weight) was further added to produce a gargle to which bone resorption suppressing activity was provided. This gargle is useful for the prevention and treatment of periodontal diseases.

30

Table 17

Ethanol	8.0 (% by weight)
Flavoring	1.0
Sorbitol	5.0
Propylene glycol	5.0
Distilled water	81.0

35

40

## Example 13

Production of chewing gum to which bone resorption suppressing activity was provided

45 [0069] The ingredients in Table 18 including a dissolved gum base were mixed and stirred, and fraction A (0.0001% by weight) was further added to produce a chewing gum to which bone resorption suppressing activity was provided. This chewing gum is useful for the prevention and treatment of periodontal diseases.

50

Table 18

Gum base	20.0 (% by weight)
Corn syrup	10.0
Dextrose monohydrate	10.0
Lactose	5.0

55

Table 18 (continued)

Glycerine	5.0
Sugar	50.0

5 [0070] Bone resorption suppressing agents of the present invention comprising a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product as an effective component are useful as agents for the prevention and treatment of bone joint diseases or periodontal diseases.

10 [0071] Further, bone joint diseases or periodontal diseases can be prevented and treated by ingesting drinks, food products or feeds to which the milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product of the present invention are admixed to provide bone resorption suppressing activity.

### Claims

15 1. A bone resorption suppressing agent comprising a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product as an effective component.

20 2. The bone resorption suppressing agent as claimed in Claim 1 to be used for the prevention and treatment of bone joint diseases or periodontal diseases.

25 3. The bone resorption suppressing agent as claimed in Claim 1 further comprising a highly absorbable calcium component, and vitamin D and/or vitamin K.

4. The bone resorption suppressing agent as claimed in Claim 2 further comprising a highly absorbable calcium component, and vitamin D and/or vitamin K.

25 5. A drink, food product, or feed wherein more than 4 µg% of a milk-derived basic cystatin and/or milk-derived basic cystatin decomposition product are admixed to provide an activity to prevent and treat bone joint diseases and periodontal diseases.

30 6. The drink, food product, or feed as claimed in Claim 4 wherein a highly absorbable calcium composition, and vitamin D and/or vitamin K are further admixed.

35

40

45

50

55



## EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 00 10 6844

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages				
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199511 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-078031 XP002144179 &amp; JP 07 002896 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 6 January 1995 (1995-01-06) * abstract *</p> <p>-----</p> <p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199823 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-254408 XP002144180 &amp; JP 10 080281 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD), 31 March 1998 (1998-03-31) * abstract *</p> <p>-----</p> <p>EP 0 373 771 A (TAISHO PHARMA CO LTD ;MITSUI TOATSU CHEMICALS (JP)) 20 June 1990 (1990-06-20) *cf. abstract, page 2, lines 29-34, lines 46-50*</p> <p>-----</p> <p>ABRAHAMSON M., ET AL.: "Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 24, 1986, pages 11282-11289, XP000917319 *cf. abstract, page 11286, table V and left col., 3rd para.*</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-6	A61K35/20		
Y		1-6	<p>TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)</p> <p>A61K</p>		
Y		1-6			
The present search report has been drawn up for all claims					
Place of search	Date of completion of the search	Examiner			
MUNICH	3 August 2000	Stoltner, A			
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS					
<p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons S : member of the same patent family, corresponding document</p>					



European Patent  
Office

## EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 00 10 6844

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim
A	<p>WO 97 14797 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 24 April 1997 (1997-04-24)  *cf. abstract, p. 2, last para. "summary of the invention", bridging with page 3, lines 1-24*</p> <p>-----</p>	1-6
The present search report has been drawn up for all claims		
Place of search	Date of completion of the search	Examiner
MUNICH	3 August 2000	Stoltner, A
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		<p>T : theory or principle underlying the invention  E : earlier patent document, but published on, or after the filing date  D : document cited in the application  L : document cited for other reasons  &amp; : member of the same patent family, corresponding document</p>
<p>X : particularly relevant if taken alone  Y : particularly relevant if combined with another document of the same category  A : technological background  O : non-written disclosure  P : intermediate document</p>		

ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.

EP 00 10 6844

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

03-08-2000

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 7002896	A	06-01-1995	NONE		
JP 10080281	A	31-03-1998	NONE		
EP 0373771	A	20-06-1990	CA 2002820 A		18-05-1990
			JP 2223529 A		05-09-1990
WO 9714797	A	24-04-1997	AU 7457996 A		07-05-1997

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-281587

(P 2 0 0 0 - 2 8 1 5 8 7 A)

(43)公開日 平成12年10月10日(2000.10.10)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード (参考)
A61K 38/55		A61K 37/64	2B150
A23G 3/30		A23G 3/30	4B001
A23K 1/16	301	A23K 1/16	301 C 4B014
	303		303 F 4B017
			303 A 4B018

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全12頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-89946

(22)出願日 平成11年3月30日(1999.3.30)

(71)出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72)発明者

高田 幸宏

埼玉県川越市小堤62-22

(72)発明者

芹澤 篤

埼玉県川越市南台3丁目-4-1-704

(72)発明者

石川 秀敏

北海道札幌市手稲区前田三条3丁目-8-

3

(72)発明者

吉岡 朋栄

北海道江別市見晴台59番地の30

最終頁に続く

(54)【発明の名称】骨吸収抑制剤

(57)【要約】

【課題】 医薬として利用できるとともに、食品や飼料に配合して利用することのできる安全性の高い骨吸収抑制剤を提供する。

【解決手段】 牛乳から調製された牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を骨吸収抑制剤とし、あるいは飲食品及び飼料に配合する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨吸収抑制剤。

【請求項 2】 骨関節疾患又は歯周病の予防及び改善に用いる請求項 1 記載の骨吸収抑制剤。

【請求項 3】 さらに、吸収性の良いカルシウム剤、及び、ビタミンD及び／又はビタミンKを含有する請求項 1 又は 2 記載の骨吸収抑制剤。

【請求項 4】 牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を 4 $\mu$ g % 以上配合して骨関節疾患及び歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料。

【請求項 5】 さらに、吸収性の良いカルシウム剤、及び、ビタミンD及び／又はビタミンKを配合した請求項 4 記載の飲食品又は飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨吸収抑制剤に関する。特に、骨関節疾患又は歯周病の予防及び改善に用いる骨吸収抑制剤に関する。

【0002】 また、本発明は、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を配合して骨関節疾患又は歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品及び飼料に関する。特に、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物に加え、吸収性の良いカルシウム剤、及び、ビタミンD及び／又はビタミンKを配合して得られる骨関節疾患及び歯周病の予防及び改善効果を賦与した飲食品及び飼料に関する。

## 【0003】

【従来の技術】 近年、高齢化に伴い、骨粗鬆症、リウマチ等の骨関節疾患が増加している。骨組織においては、たえず骨形成と骨吸収が営まれており、若い時には骨形成と骨吸収のバランスがとれているが、加齢に伴い種々の原因からそのバランスが骨吸収に傾いてくる。この状態が長期間続くと、骨組織が脆くなり、骨粗鬆症、骨折、腰痛等の骨疾患を生じることになる。このアンカッピングを防ぐことができれば、骨粗鬆症、骨折、腰痛等を予防できると考えられている。

【0004】 従来より、アンカッピングを防ぎ骨疾患を予防・治療する方法として、(1)食事によるカルシウムの補給、(2)軽い運動、(3)日光浴、(4)薬物治療等が行われてきた。

【0005】 食事によるカルシウムの補給には炭酸カルシウム及びリン酸カルシウム等のカルシウム塩や牛骨粉、卵殻及び魚骨粉等の天然カルシウム剤が使われている。食品及び食品素材のこれまでの使用目的は、全てカル

ルシウムの補給である。

【0006】 軽い運動については、軽いランニングや散歩等が良いとされるが、体が弱っていると軽い運動もやっかいなものとなり、まして寝たきりの老人になると殆ど運動できなくなる。

【0007】 また、日光浴は活性化ビタミンD<sub>3</sub>の補給という点では良いとされているが、これだけでは不十分である。

【0008】 薬物治療としては、1 $\alpha$ -ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン製剤等が骨粗鬆症の治療及び改善に効果があることが知られている。カルシトニン製剤は、医薬品としてのホルモン製剤であり、食品素材から得られる安全な物質については、検討されていないのが現状である。また、カルシトニンを製造するには、動物組織、細胞、血液や尿を原料としなければならないために、大量調製が難しく、また、安全性の点から食品素材として提供することは困難である。

【0009】 また、関節疾患であるリウマチは、骨吸収を伴う疾患であることから、骨吸収を抑制することでリウマチを予防及び改善できると考えられる。

【0010】 また、近年、歯周病も大きな社会問題となっている。歯周病は、虫歯と異なり、歯の根元を弱らせて虫歯でない歯をも使えない病気である。最近では、多くの人が歯周病の兆候を示しており、むしろ虫歯よりも怖い病気であると言える。

【0011】 現在、歯周病の予防法としては、歯垢を除去することや、抗菌剤を含有するうがい剤（マウスウォッシュ）等を用いたうがい等、原因菌となる微生物の繁殖を防止する観点からの予防が行われているが、これらの方法は過度に進行が進んだ症状に対しては効果が小さいと考えられる。すなわち、歯周病の末期には、歯槽骨の減少がみられ、一度歯槽骨が失われると再生されにくく、その結果として歯を失うと、食物が食べにくくなるほか、痛みを伴うこと等から生活に支障をきたすため、有効な予防・治療手段が求められている。

【0012】 しかしながら、現在のところ、歯槽骨の減少を抑制する効果を持つ歯周病の予防及び改善剤はない。

【0013】 このように、歯周病も骨粗鬆症とともに大きな社会問題になっており、これについても歯周病の改善に効果があれば、人々の健康に大きなメリットがあると考えられ、歯周病を改善するものについても、かなり必要とされている。

【0014】 本発明者らは、このような骨関節疾患及び歯周病の予防及び改善に利用できる物質を得るために、乳清タンパク質中の骨芽細胞増殖作用、骨吸収抑制作用及び骨強化作用を有する画分の探索を続けてきた。すなわち、牛乳、特に乳清のタンパク質を分画し、骨吸収抑制作用を有する画分の取得を試み、逆浸透膜や電気透析

等の処理により乳清タンパク質の水溶性画分から乳清由来の塩を除去して得られたタンパク質及びペプチド混合物に骨強化作用があることを見出した（特開平4-183371号公報）。また、このタンパク質及びペプチド混合物の水溶液をエタノール処理、加熱処理、加塩処理、限外濾過膜処理して得られる画分に骨強化作用があることを見出した（特開平5-176715号公報、特開平5-320066号公報）。また、乳中に微量存在する塩基性タンパク質に骨芽細胞コラーゲン合成促進作用及び骨吸収抑制作用があることを見出した（特開平8-151331号公報）。

【0015】シスタチンは、活性中心にSH基を持つシステインプロテアーゼのタンパク質分解活性を阻害するシステインプロテアーゼインヒビターであり、動物組織、細胞、尿中に見出されている。シスタチンの有用な作用として、ウイルスの増殖阻害作用が確認されている（Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.127, p.1072, 1985）。

【0016】特開平2-223529号公報には、シスタチンを、注射用製剤、座薬、経鼻粉末剤等の形態で抗アレルギー剤及び骨疾患治療剤として用いること、具体的には遺伝子組換えにより作成されたラット由来のシスタチン $\alpha$ をラットに静脈注射して用いることにより、ラットの血中カルシウムが低下した旨の試験結果が記載されている。しかしながら、この結果だけから直ちに、シスタチンが骨粗鬆症及びリウマチ等の骨関節疾患の予防改善効果を有するといえるものではない。

【0017】また、シスタチンを静脈等から投与するのではなく、経口投与で効果の得られる牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨吸収抑制剤、及び、これを高濃度で含有させ、さらにカルシウムやビタミンをともに配合し、これらの成分を経口摂取できるようにした医薬、飲食品及び飼料はこれまでに知られていない。

【0018】なお、本発明者らは、以前に牛乳由来塩基性シスタチン以外のシステインプロテアーゼインヒビターについて出願（特開平07-126294号公報）したが、本発明の牛乳由来塩基性シスタチンは、これと比べても骨吸収抑制活性が高いものである。

#### 【0019】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、骨吸収抑制作用を有する塩基性タンパク質について、活性本体の分離精製を試み、得られた物質の同定を行ったところ、この物質が牛乳由来塩基性シスタチンであることを見出した。また、本発明者らは、牛乳由来塩基性シスタチンは、それ以外のシスタチンに比べても特に高い骨吸収抑制作用を有することを見出した。さらに、牛乳由来塩基性シスタチンの分解物にも高い骨吸収抑制作用が存在することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0020】したがって、本発明は、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を

有効成分とする骨吸収抑制剤を提供すること、及び、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を配合して骨吸収抑制効果を賦与した飲食品及び飼料を提供することを課題とする。

【0021】なお、本発明では、食品である牛乳を原料として、安全性の高い牛乳由来塩基性シスタチンを、安全な食品素材として大量に調製して配合することができ、産業上有用なものである。

#### 【0022】

10 【課題を解決するための手段】本発明者らは、牛乳から分離された牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物が優れた骨吸収抑制効果を有することを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明により、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨吸収抑制剤が提供される。また、本発明では、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を飲食品及び飼料に配合することで、飲食品及び飼料に骨吸収抑制効果を賦与することができる。さらに、本発明で

20 20 【0023】より具体的には、前記した牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物の骨吸収抑制効果に基づいて、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨関節疾患又は歯周病の予防及び改善に用いる骨吸収抑制剤とすることができる、また、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を飲食品及び飼料に骨吸収抑制効果及び骨形成促進効果の両方を賦与することもできる。

30 30 【0024】本発明では、食品である牛乳を原料として調製された安全な牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を、飲食品及び飼料に配合して骨吸収抑制効果を賦与することができる。

40 【0025】牛乳由来塩基性シスタチンの原料である牛乳としては、生乳、粉乳、脱脂乳、還元乳等が用いられる。そして、これらの牛乳から、加熱処理、加塩処理、エタノール処理、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィー等の各種クロマト処理、限外濾過膜処理等を行うことにより、牛乳由来塩基性シスタチンを得ることができる。

40 【0026】また、本発明の牛乳由来塩基性シスタチン分解物は、前記の牛乳由来塩基性シスタチンを、例えば、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カリクレイン、カテプシン、サーモライシン、V8

プロテアーゼ等のプロテアーゼで限定分解して得られるペプチド混合物である。

【0027】本発明では、このような牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を飲食品に含有させて、飲食品に骨吸収抑制効果を賦与することができる。飲食品としては、牛乳、乳飲料、ジュース、ゼリー、ビスケット、パン、麺、ソーセージ等が例示できる。そして、このようにして骨吸収抑制効果を賦与された飲食品を摂取することにより、骨粗鬆症、リウマチ等の骨関節疾患や、歯周病を予防又は改善することができる。

【0028】本発明において、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を骨関節疾患の予防又は改善のために用いるには、有効成分である牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を、医薬として、あるいは飲食品及び飼料に配合して、成人一人一日当たり  $8\text{ }\mu\text{g} \sim 10\text{mg}$  程度の量を数回に分けて摂取できるようにすれば、骨粗鬆症やリウマチ等の骨関節疾患を予防又は改善することができ有用である。なお、特に、飲食品又は飼料に配合して用いる場合は、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を飲食品又は飼料中に  $4\text{ }\mu\text{g} \%$  以上含有させるようにすると、前記量を簡単に摂取することができ好ましい。

【0029】本発明において、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を歯周病の予防又は改善のために用いるには、有効成分である牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を、医薬として、あるいは飲食品及び飼料に配合して、例えば、歯磨き剤、うがい剤、飴、ガム、トローチ等の形態とし、成人一人一日当たり  $4\text{ }\mu\text{g} \sim 4\text{mg}$  程度の量を数回に分けて歯の表面に接触させるように投与又は摂取できるようにすれば、歯周病を予防又は改善することができ有用である。

【0030】また、本発明の骨吸収抑制剤、あるいは飲食品及び飼料には、吸収性の良いカルシウム塩を併せて配合することが望ましい。このような吸収性の良いカルシウム塩としては、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、卵殻あるいは牛乳由来のカルシウム含有物等を例示することができる。また、ビタミンDやビタミンK等の骨に有効な成分を配合することもできる。この場合、前記のような吸収性の良いカルシウムやビタミン類を配合することにより、骨形成促進効果を賦与することができるので、牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物により賦与される骨吸収抑制効果との相乗的な効果が得られ望ましい。

【0031】なお、牛乳由来塩基性シスタチンは、食品に配合されたものを摂取しても骨吸収抑制効果があり、熱安定性が良好で、食品加工上、極めて優れたものである。

【0032】次に、本発明を実施例及び試験例を挙げて詳細に説明する。

【0033】

【実施例1】牛乳由来塩基性シスタチンの調製

Sセファロース 3,000g を充填したカラムを脱イオン水で充分洗浄し、脱脂乳10,000Lを通液し、脱イオン水で充分洗浄した後、0.1～1.0Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した。得られた画分を90°Cで10分間加熱処理し、遠心分離することにより沈澱を除去した。そし

て、牛乳由来塩基性シスタチンを含む溶出画分を再度 Mono S イオン交換クロマトグラフィーで分画した。さらに、この画分をFPLCシステムによりMonoQ イオン交換クロマトグラフィー、Superose12ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、さらにHPLCシステムにてヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー及びC4逆相クロマトグラフィーで順次処理し、牛乳由来塩基性シスタチン 58 mg (画分A)を得た。

【0034】

【実施例2】牛乳由来塩基性シスタチンの調製

20 5%乳清タンパク質溶液 10,000Lを90°Cで10分間加熱処理し、遠心分離することにより沈澱を除去した。さらに、カルボキシメチル化パバインをトレシルトヨパール (Tresyl-Toyopearl、東ソー社製) に結合させた担体をカラムに充填後、0.5M塩化ナトリウム溶液で平衡化し、先の乳清タンパク質溶液を通液した。通液後、0.5M塩化ナトリウム溶液と 0.1% Tween 20 を含む0.5M塩化ナトリウム溶液で順次カラムを洗浄した。次いで、20mM 醋酸-0.5M塩化ナトリウム溶液でシステインプロテアーゼを溶出させた。溶出画分を直ちに 1M 水酸化ナトリウム溶液で中和し、MonoS 隅イオン交換クロマトグラフィー、さらにHPLCシステムにてヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー及びC4逆相クロマトグラフィーで順次処理して分画し、牛乳由来塩基性シスタチン48mg (画分B)を得た。

【0035】

【実施例3】牛乳由来塩基性シスタチン分解物の調製

実施例1で得られた画分A 25mg を、水 100mlに懸濁し、最終濃度が 1%となるようにパンクレアチンを加えて、37°Cで 5 時間酵素処理した。そして、90°Cで 5 分間40 加熱処理して酵素を失活させた後、凍結乾燥して、牛乳由来塩基性シスタチン分解物 23 mg (画分C)を得た。

【0036】また、実施例2で得られた画分B 25mg を、同様に処理し、牛乳由来塩基性シスタチン分解物 24 mg (画分D)を得た。

【0037】

【試験例1】牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物の骨吸収抑制効果

生後10～20日齢の ICR 系マウスの長管骨を摘出し、軟組織を除去した後、5%牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 液中で骨を機械的に細切り、破骨細胞を含む全骨髓細胞

を得た。この細胞約  $2 \times 10^4$  を象牙片の上に 5% 牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 溶液でスポットした。数時間後、牛乳由来塩基性シスタチン又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を 50ng/ml となるように添加した 5% 牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 溶液を加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で 5 日間培養し、破骨細胞の骨吸収活性を調べた。

【0038】培養後、象牙片上の細胞を剥がしてヘマトキシリン染色し、画像解析装置 (PIASLA-55

5、PIAS 社製) により画像解析して骨吸収窓 (pit) 数を測定した。測定結果から、次式で定義される骨吸収活性 (%) を求め、骨吸収抑制効果を評価した。

【0039】骨吸収活性 (%) = (試験試料添加群の骨吸収窓数 / 試験試料無添加群の骨吸収窓数) × 100

試験試料としては、実施例 1 ~ 3 で得られた牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物 (画分 A ~ 画分 D)、以下に示す牛乳由来以外のシスタチン、及び牛乳由来システィンプロテアーゼインヒビターを用いた。

【0040】

試験試料	骨吸収活性 (%、 $\pm$ SD)
画分 A	44.2 ± 6.9
画分 B	55.8 ± 5.2
画分 C	32.5 ± 5.6
画分 D	41.3 ± 4.7
シスタチン (卵由来 (Egg White))	75.1 ± 3.5
シスタチン (人由来 (Placenta))	78.1 ± 2.9
シスタチン (人由来 (Plasma))	79.5 ± 1.9
シスタチン (牛由来 (Urine))	77.2 ± 3.7
シスタチン (牛由来 (Plasma))	68.7 ± 3.3
システィンプロテアーゼインヒビター (牛乳由来 (Milk))	64.3 ± 2.5

【0042】

【試験例 2】牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物の骨吸収抑制効果及び骨強化作用実施例 1 及び 3 で得られた画分 A 及び画分 C について、骨粗鬆症モデルラットを用いた投与試験により骨吸収抑制効果を検討した。

【0043】投与試験用の飼料として、画分 A 又は画分 C を配合した飼料、画分 A 又は画分 C、カルシウム源として吸収性の高い牛乳由来カルシウム剤 (乳Ca; 特開平

1. シスタチン (卵由来 (Egg White); 純度99%以上)  
2. シスタチン (人由来 (Placenta); 純度99%以上)  
3. シスタチン (人由来 (Plasma); 純度99%以上)  
4. シスタチン (牛由来 (Urine); 純度99%以上)  
5. シスタチン (牛由来 (Plasma); 純度99%以上)  
6. システィンプロテアーゼインヒビター (特開平07-126294 号公報参照) (牛乳由来 (Milk); 純度99%以上)

結果を表 1 に示す。牛乳由来塩基性シスタチン又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を添加した培地で培養すると、無添加の培地で培養した時に比べて、骨吸収が抑制された。また、牛乳由来塩基性シスタチン又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物 (画分 A ~ 画分 D) では、それ以外のシスタチンに比べて骨吸収活性が大きく抑制されており、牛乳由来塩基性シスタチンが優れた骨吸収抑制効果を有することが確認された。

【0041】

【表 1】

4-306622 号公報参照)、ビタミン D 200IU を配合した飼料を調製して用いた。

【0044】投与試験に用いた飼料の組成を表 2 に示す。なお、飼料中のカルシウム量とリン量は共に全ての群で飼料 100g 当たり 300mg になるようにし、カルシウム : リン比を 1 : 1 として調製した。

【0045】

【表 2】

対照 (Cont)	シャム (Sham)	画分		画分+乳Ca <sup>3)</sup> +V D <sup>4)</sup>	
		A	C	A	C
蔗糖	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
カゼイン	20.0	20.0	18.0	18.0	18.0
コーンスターク	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
セルロース	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
トウモロコシ油	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
(コリン含む)					
ミネラル混合	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>1)</sup>	4.5 <sup>2)</sup>
画分A	—	—	0.00004	—	0.00004
画分C	—	—	—	0.00004	—

(単位: g/100g)

- 1) 炭酸カルシウムをカルシウム源とした。
- 2) 牛乳由来カルシウム剤をカルシウム源とした。
- 3) ビタミンD 200IUを配合した。

【0046】実験動物としては、32週齢のSD系雌性ラットを用いた。このラットを、一週間予備飼育した後に卵巢摘出手術を施し、低カルシウム食で2カ月間飼育することにより、骨粗鬆症モデルラットを作成した。また、卵巢を摘出しない疑似手術を施したシャムラットも7匹作成した。

【0047】投与試験は、前記ラットを、対照群、シャム群、画分A群、画分C群、画分A+乳カルシウム+ビタミンD群、画分C+乳カルシウム+ビタミンD群の6群（1試験群7匹）に分け、表2の試験食を1カ月間投与して行った。

【0048】試験飼料投与後、各試験群のラットの大腿骨を摘出し、骨塩量測定装置で骨塩量を測定し、破断特性測定装置で骨強度を測定した。

【0049】結果を表3及び表4に示す。

【0050】表3に示したように、大腿骨の骨塩量は、対照群に比べて画分A又は画分Cを配合した各群で統計的に有意に高い値を示した。このことから、画分A及び画分Cには骨吸収抑制効果があることがわかった。また、吸収性の良い乳カルシウム及びビタミンDを添加することにより、さらに効果が増強した。

【0051】さらに、表4に示したように、大腿骨破断力は、対照群に比べて画分A又は画分Cを配合した各群で統計的に有意に高い値を示した。このことから、画分A及び画分Cには骨強化作用があることがわかった。ま

た、吸収性の良い乳カルシウム及びビタミンDを添加することにより、さらに効果が増強した。

【0052】なお、ビタミンDの代わりにビタミンKを配合した試験でも同様な結果が得られた。

【0053】前記の結果から、牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物には骨吸収抑制効果及び骨強化作用があることがわかった。

【0054】

【表3】

骨塩量 (mg, ± SD)	
シャム	136.2 ± 6.3 *
対照	116.3 ± 5.9
画分A	122.4 ± 4.3 *
画分C	123.8 ± 5.1 *
画分A+乳Ca+ビタミンD	126.1 ± 2.9 *
画分C+乳Ca+ビタミンD	127.3 ± 3.1 *

\* 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

【0055】

【表4】

骨破断エネルギー ( $\times 10^5$  erg)

シャム	13.4 ± 2.6 *
対照	8.3 ± 1.7
画分A	10.8 ± 3.1 *
画分C	10.5 ± 4.1 *
画分A+乳Ca+ビタミンD	11.3 ± 2.3 *
画分C+乳Ca+ビタミンD	11.5 ± 2.6 *

\* 対照群に対して有意差あり (P&lt;0.05)

## 【0056】

【試験例3】表5の配合で各成分を混合して容器に充填し、加熱滅菌して飲料を製造した。なお、タンパク質量を合わせるために、対照群では、アルブミンを添加した。

【0057】変形性関節症（関節の開裂の収縮）の患者20人を10人ずつ2群に分け、飲料を1ヶ月間飲用し、飲用前と飲用後の骨吸収の骨代謝マーカーである尿中デオキシビリジノリン量を測定した。

【0058】結果を表6及び表7に示す。表6に示すよ

うに、カルシウム及びビタミンを配合した対照群もデオキシビリジノリン量が減少したものの、試験群ではさらに大きく減少した。この結果から、骨の破壊による骨吸収が極めてよく抑えられていることが推定された。また、表7に示すように、関節痛に対しても、各項目について痛みが軽減していることがわかった。さらに、牛乳由来塩基性シスタチンを配合したチーズでも同様な傾向が見られた。

## 【0059】

## 【表5】

成分	対照群	試験群	
結晶ブドウ糖	15.0	15.0	(重量%)
画分A		0.000008	
アルブミン	0.000008		
カルシウム	0.5	0.5	
ビタミンD	(200IU)	(200IU)	
水	74.0	74.0	

## 【0060】

## 【表6】

## デオキシビリジノリン減少量 (nmol/day, ± SD)

対照群	0.32 ± 0.3
試験群	0.99 ± 0.2 *

\* 対照群に対して有意差あり (P&lt;0.05)

## 【0061】

## 【表7】

## 投与前後の各項目の関節痛者数 (人)

	対照群		試験群	
	投与前	投与後	投与前	投与後
物理的圧迫の関節痛	10	10	10	8
動作時の関節痛	5	5	6	2
就寝時の関節痛	5	4	5	0
疲労時の関節痛	8	8	9	5
脱力感	7	7	6	1
開裂全体の関節痛	9	8	9	3

## 【0062】

【試験例4】6週齢のゴールデンハムスター48匹を1週間予備飼育した後、エーテル麻酔下でM1の歯頸部に滅菌した手術用縫合糸No4を5重に巻き付け、Keyesらの飼料(D#2000: Keyes, P.H. and Jordan: Archs. Oral. Biol. 9: 377-400, 1964)で飼育することにより歯周病を発病させた。次いで、ゴールデンハムスターを、対照群、画分A群、画分B群、画分C群の4群に分け、画分A群、画分B群、画分C群には、一日2回、各画分4 $\mu$ gを適当に希釈した試験液で口腔内を約10分間絶えず浸す処置を毎日継続して行った。処置開始から4日後及び7日後に、各群につき6匹を選び、2.5%グルタルアルデヒド溶液(pH7.4)を用いて約20分間固定灌流した後、下頸骨両側を摘出し、次の方法で歯槽骨減少量を評価し

20

30

た。すなわち、摘出された下頸骨両側を2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定した後、軟X線撮影して、写真を画像解析装置(PIAS LA-555)を用いて解析し、M1付近のエナメルセメント境と歯槽骨頂間の面積を計測することによって、歯槽骨減少量を評価した。

【0063】結果を表8に示す。画分A群、画分B群、画分C群のゴールデンハムスターは、対照群に比べて、歯槽骨減少量が有意に低かった。このことから、牛乳由来塩基性シスタチン及び牛乳由来塩基性シスタチン分解物は、歯槽骨減少を抑制し、歯周病の予防及び改善に効果的であることがわかった。

## 【0064】

## 【表8】

	対照	画分A	画分B	画分C
減少面積 (mm <sup>2</sup> )				
4日	0.31	0.16 *	0.18 *	0.15 *
7日	0.98	0.53 *	0.58 *	0.47 *

\* 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

## 【0065】

【実施例4】骨吸収抑制効果を賦与した飲料の製造  
表9の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分A 0.000004 重量%及びビタミンD 200IUを添加して容器に充填し、加熱滅菌して、骨吸収抑制効果を賦与した飲料を製造した。この飲料は、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

## 【0066】

## 【表9】

混合異性化糖	15.0	(重量%)
果汁	10.0	
クエン酸	0.5	
香料	0.1	
カルシウム	0.5	
水	73.9	

15

## 【実施例5】骨吸収抑制効果を賦与した錠剤の製造

表10の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分A 0.0005重量%及びビタミンD 200IUを添加し、加圧成型して、骨吸収抑制効果を賦与した錠剤を製造した。この錠剤は、骨関節疾患の予防及び改善用錠剤として有用である。

【0068】

【表10】

含水結晶ブドウ糖	93.5	(重量%)
カルシウム	5.0	
シュガーエステル	1.0	
香料	0.5	

【0069】

## 【実施例6】骨吸収抑制効果を賦与したビスケットの製造

表11の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分B 0.00005重量%を添加してドウを作成し、成型した後、ばい焼して、骨吸収抑制効果を賦与したビスケットを製造した。このビスケットは、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

【0070】

【表11】

小麦粉	50.0	(重量%)
砂糖	20.0	
食塩	0.5	
マーガリン	12.5	
卵	12.1	
水	4.1	
炭酸水素ナトリウム	0.1	
重炭酸アンモニウム	0.2	
炭酸カルシウム	0.5	

【0071】

## 【実施例7】骨吸収抑制効果を賦与したゼリー食品の製造

表12の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分D 0.000008重量%を添加し、容器に充填した後、加熱滅菌して、骨吸収抑制効果を賦与したゼリー食品を製造した。このゼリー食品は、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

【0072】

【表12】

( 9 )

16

果糖	20.0	(重量%)
グラニュー糖	15.0	
水飴	5.0	
寒天	1.0	
香料	0.1	
カルシウム	0.1	
水	58.8	

【0073】

## 【実施例8】骨吸収抑制効果を賦与したチーズの製造

表13の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分A 0.00005重量%を添加し、乳化温度85°Cで乳化して、骨吸収抑制効果を賦与したチーズを製造した。このチーズは、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

【0074】

【表13】

20

ゴーダチーズ	43.0	(重量%)
チェダーチーズ	43.5	
クエン酸ナトリウム	2.0	
牛乳由来カルシウム	1.0	
水	10.5	

【0075】

## 30 【実施例9】骨吸収抑制効果を賦与したヨーグルトの製造

12%脱脂乳に90°Cで20分間加熱殺菌した後、ラクトバチルス・アシドフィルス(*L. acidophilus*)及びストレプトコッカス・サーモフィルス(*S. thermophilus*)をそれぞれ接種し、二種類のスターターカルチャーを得た。そして、牛乳を主成分とするヨーグルトミックスを用い、表14の配合に従って成分を混合したものに対して、さらに画分B 0.000008重量%を添加し、常法に従って発酵冷却を行い、骨吸収抑制効果を賦与したヨーグルトを製造した。このヨーグルトは、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

【0076】

【表14】

40

ヨーグルトミックス	97.0	(重量%)
培養物( <i>L. acidophilus</i> )	1.5	
培養物( <i>S. thermophilus</i> )	1.5	

【実施例 10】骨吸収抑制効果を賦与したイヌ飼育用飼料の製造

表 15 の配合に従って成分を混合し、さらに、画分 A 0.00001 重量%を添加して、骨吸収抑制効果を賦与したイヌ飼育用飼料（ドッグフード）を製造した。このイヌ飼育用飼料は、骨関節疾患の予防及び改善のために有用である。

【0078】

【表 15】

大豆粕	12.0	(重量%)
脱脂粉乳	14.0	
大豆油	4.0	
コーン油	2.0	
パーム油	28.0	
トウモロコシ澱粉	15.0	
小麦粉	9.0	
ふすま	2.0	
ビタミン混合物	9.0	
ミネラル混合物	2.0	
セルロース	3.0	

10 【表 16】

グリセリン	70.0	(重量%)
二酸化ケイ素	20.0	
キサンタンガム	1.0	
ミントフレーバー	1.0	
二酸化チタン	0.7	
フッ化ナトリウム	0.3	
蒸留水	7.0	

【0081】

【実施例 12】骨吸収抑制効果を賦与したうがい剤の製造

表 17 に示す配合に従って成分を混合したものに対し、さらに画分 B 0.00001 重量%を添加して、骨吸収抑

制効果を賦与したうがい剤を製造した。このうがい剤は、歯周病の予防及び改善用うがい剤として有用である。

40 【0082】

【表 17】

エタノール	8.0	(重量%)
香料	1.0	
ソルビトール	5.0	
プロピレングリコール	5.0	
蒸留水	81.0	

【0083】

50 【実施例 13】骨吸収抑制効果を賦与したガムの製造

表18に示す配合に従い、ガムベースを溶解して各成分を混合攪拌したものに対して、さらに、画分A 0.0001重量%を添加し、成形して、骨吸収抑制効果を賦与したガムを製造した。このガムは、歯周病の予防及び改善の

ために有用である。  
【0084】  
【表18】

ガムベース	20.0	(重量%)
コーンシロップ	10.0	
デキストロース1水和物	10.0	
ラクトース	5.0	
グリセリン	5.0	
糖	50.0	

## 【0085】

【発明の効果】本発明の牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を有効成分とする骨吸収抑制剤は、骨関節疾患又は歯周病の予防及び改善剤として有用なものである。

【0086】また、本発明の牛乳由来塩基性シスタチン及び／又は牛乳由来塩基性シスタチン分解物を配合して骨吸収抑制効果を賦与した飲食品及び飼料を摂取することにより、骨関節疾患又は歯周病を予防及び改善することができ、有用である。

## フロントページの続き

(51)Int.C1'	識別記号	F I	マークド(参考)
A 2 3 K	1/175	A 2 3 K 1/175	4 C 0 8 4
A 2 3 L	1/30	A 2 3 L 1/30	A 4 C 0 8 6
			Z 4 C 2 0 6
	2/52	2/38	N
	2/38		B
A 6 1 P	1/02	A 6 1 K 31/00	6 0 1 B
	19/10		6 1 9 E
	19/08		6 1 9 D
	43/00	31/12	6 4 3 A
A 6 1 K	31/12	31/59	
	31/59	33/06	
	33/06	A 2 3 C 9/13	
// A 2 3 C	9/13	19/084	
	19/084	A 2 3 L 2/00	F

(72)発明者 青江 誠一郎

埼玉県狭山市新狭山2-8-9 ワコ一第  
2新狭山マンション406

Fターム(参考) 2B150 AA06 AB10 BB03 DC23 DD01  
DE14 DE16 DH04  
4B001 AC31 AC40 AC46 BC14 EC05  
4B014 GB07 GB13 GG02 GG07 GG10  
GG14 GK05 GK09 GL01 GL09  
4B017 LC03 LE03 LK15 LK18 LP08  
4B018 LB01 LB02 LB05 LB07 LB08  
MD04 MD20 MD22 MD23 MD71  
ME05  
4C084 AA02 BA43 BA44 DC32 MA02  
NA14 ZA671 ZA672 ZA961  
ZA962 ZA971 ZC202 ZC212  
ZC232 ZC292  
4C086 AA01 AA02 DA15 DA16 HA04  
MA01 MA03 MA04 MA08 MA52  
NA14 ZA67 ZA96 ZA97 ZC21  
ZC23 ZC29  
4C206 AA01 AA02 CB28 MA03 MA04  
MA72 NA14 ZA67 ZA96 ZA97  
ZC21 ZC23 ZC29